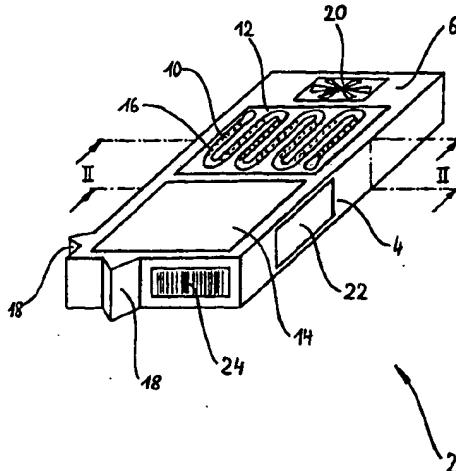




(51) Internationale Patentklassifikation 6 :  C12Q 1/68		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/57310  (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 11. November 1999 (11.11.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/02918  (22) Internationales Anmeldedatum: 29. April 1999 (29.04.99)  (30) Prioritätsdaten: 198 19 537.0 30. April 1998 (30.04.98) DE		(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AT (Gebrauchsmuster), AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE (Gebrauchsmuster), DK, DK (Gebrauchsmuster), EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BIOCHIP TECHNOLOGIES GMBH [DE/DE]; Engesserstrasse 4b, D-79108 Freiburg (DE).  (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BERNAUER, Hubert, S. [DE/DE]; Webergasse 38, D-79249 Merzhausen (DE).  (74) Anwalt: VOSSIUS & PARTNER; Siebertstrasse 4, D-81675 München (DE).		Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
<p><b>(54) Title:</b> INSTRUMENT FOR ANALYSIS AND DIAGNOSTICS</p> <p><b>(54) Bezeichnung:</b> ANALYSE- UND DIAGNOSTIKINSTRUMENT</p> <p><b>(57) Abstract</b></p> <p>The invention relates to an analysis and diagnostics instrument – an analysis chip for examining biological samples. Said analysis chip essentially consists of a support on whose surface at least one biomolecular matrix is applied in the form of dots, each dot in the matrix representing an individual species of molecule. The biological sample to be examined is allowed to flow through a microfluidic structure. Preferably at least one medium is provided on the surface of the support, the biomolecular matrix being located on said medium. The analysis chip also has an optical lens field and optionally, optical gratings which are arranged in such a way as to correspond to the biomolecular matrix. An analysis of the biological sample can then be carried out by real-time measurement of the hybridisation with detection of the mass attachment or detection of fluorochrome molecules which were previously built into the probe material.</p> <p><b>(57) Zusammenfassung</b></p> <p>Die Erfindung betrifft ein Analyse- bzw. Diagnostikinstrument – kurz Analysechip – mit dem biologische Proben untersucht werden können. Der Analysechip besteht im wesentlichen aus einem Träger, auf dessen Oberfläche mindestens eine Biomolekülmatrix in Form von Dots aufgebracht ist, wobei jeder Punkt der Matrix eine individuelle Molekilspezies repräsentiert und die zu untersuchende biologische Probe durch eine mikrofluidische Struktur strömt. An der Oberfläche des Trägers ist vorzugsweise mindestens ein Medium vorgesehen, auf dem sich die Biomolekülmatrix befindet. Der Analysechip weist ferner ein optisches Lisenfeld und gegebenenfalls entsprechend der Biomolekülmatrix angeordnete optische Gitter auf, so dass eine Auswertung der biologischen Probe durch Echtzeit-Messung der Hybridisierung mit einem Nachweis der Massenanlagerung oder ein Nachweis von Fluorochrommolekülen, die zuvor in das Sondenmaterial eingebaut wurden, möglich ist.</p>			



***LEDIGLICH ZUR INFORMATION***

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

### Analyse- und Diagnostikinstrument

Die Erfindung betrifft ein Analyse- und Diagnostikinstrument zur Untersuchung von biologischen Proben, insbesondere von DNA-Molekülen.

Im Bereich der biologischen und medizinischen Labortechnik ist eine Reihe von Analyse- bzw. Diagnostikinstrumenten bekannt. In bestimmten Ausgestaltungen werden diese üblicherweise auch als Analysechips bezeichnet. Ist der Analysechip zur Untersuchung von DNA-Molekülen vorgesehen, so nennt man ihn DNA-Analysechip, DNA-Array oder DNA-Grid. Die Begriffe Analysechip und Analyse- und Diagnostikinstrument werden im weiteren synonym verwendet.

Herkömmliche Analysechips bestehen üblicherweise im wesentlichen aus einem Trägermaterial, in dessen Oberfläche Mulden geätzt sind, in die im Fall einer DNA-Analyse verschiedene DNA-Moleküle eingebunden sind. Durch das Inkontaktbringen einer zu untersuchenden DNA-Probe auf die in den Mulden ge-

1 bundenen DNA-Moleküle kann es zu einer Hybridisierung kommen, die Signale über die An- bzw. Abwesenheit und gegebenenfalls die Konzentration von Nucleinsäuren in der Hybridisierungslösung liefern. Ein spezieller Analysator liest die  
5 Hybridisierungsdaten dann aus. Der Nachweis der Hybridisierungsreaktion erfolgt herkömmlicherweise durch optische Verfahren, wie beispielsweise durch Lichteinkopplung über ein Gitter. Bei der Massenanlagerung wird das evaneszente Feld gestört, wodurch eine Störung im Fernfeld meßbar ist. Herkömmliche Analysechips benutzen als Trägermaterial im allgemeinen Silizium, das ein nicht-transparentes Medium enthält,  
10 auf dem die DNA-Moleküle in den Mulden gebunden sind.

15 Analoge, nicht hochintegrierte Systeme, wie ELISA-Systeme, haben insbesondere die Nachteile, daß die zu untersuchende biologische Probe auf jedes Referenzmolekül in den Mulden einzeln aufgebracht werden muß, die Lichteinkopplung zum Nachweis der Hybridisierungsreaktion ineffizient ist, eine Justierung des Analysechips im Analysator schwierig ist, die  
20 Verwaltung und Prozessierung von Daten und Parametern aufwendig ist und die Kosten für die Herstellung und den Betrieb sehr hoch sind.

25 Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein verbessertes Analyse- bzw. Diagnostikinstrument bzw. -verfahren zur Verfügung zu stellen.

30 Zur Lösung dieser Aufgabe geht die Erfindung von dem Grundgedanken aus, einen Analysechip zur Untersuchung von biologischen Proben bereitzustellen, der im wesentlichen aus einem Träger besteht, auf dessen Oberfläche mindestens eine Biomolekülmatrix aus einzelnen Punkten (Dots) auf einen Boden einer mikrofluidischen Struktur, wie z.B. einer Mäanderstruktur, oder eine planare Oberfläche aufgebracht ist. Die  
35 zu untersuchende biologische Probe wird an einem Ende der mikrofluidischen Struktur aufgebracht und strömt entlang dieser Struktur zum anderen Ende, wobei die Probe beim Überströmen der jeweiligen Matrixpunkte, die jeweils eine indi-

1 individuelle Molekülspezies repräsentieren, bestimmte Reaktionen auslöst.

5 Diese Reaktion ist, sofern eine Nucleinsäure nachgewiesen werden soll, üblicherweise eine Hybridisierungsreaktion. Je nach Einstellen der Hybridisierungsbedingungen (stringente oder nicht-stringente Hybridisierungsbedingungen) sind Moleküle in der Probe detektierbar, die einen mehr oder weniger großen Ähnlichkeits- bzw. Homologiegrad mit der komplementären Molekülspezies auf der Oberfläche oder einem Teil davon 10 aufweisen. Derartige Hybridisierungsbedingungen hängen beispielsweise von der Temperatur oder der Salzkonzentration in der Probe ab und können vom Fachmann nach üblichen Verfahren eingestellt werden. So kann beispielsweise die Salzkonzentration in einer Probe eingestellt werden. Die Einstellung 15 von Hybridisierungsbedingungen ist im Stand der Technik bekannt und kann z.B. auf der Basis der Lehre in Hames und Higgins, "Nucleic acid hybridisation, a practical approach", IRL Press, Oxford 1985 erfolgen.

20 Ist das in der biologischen Probe nachzuweisende Molekül ein Protein oder Peptid, so stehen dem Fachmann eine Reihe von Möglichkeiten zur Verfügung, wie er dieses mit dem erfindungsgemäßen Analysechip nachweisen kann. Eine Möglichkeit ist die Einbindung des Moleküls in einen Antikörper-Sandwich, wobei der nicht an die Oberfläche fixierte Antikörper 25 (oder ein Derivat davon) vorzugsweise nachweisbar markiert ist.

30 Selbstverständlich sind erfindungsgemäß auch andere Molekülarten in einer biologischen Probe mit dem Analysechip nachweisbar.

Der Begriff "biologische Probe", wie erfindungsgemäß verwendet, bedeutet im weitesten Sinne, daß die Probe biologisches Material wie Nucleinsäuren oder Proteine oder Derivate oder 35 Fragmente davon enthält. Nucleinsäuren können beispielsweise durch Verfahren der rekombinanten DNA-Technologie modifi-

1 ziert, fragmentiert etc. worden sein. Proteine können z.B.  
aus einer natürlichen Quelle vor der Analyse angereichert  
worden sein. In einer Ausführungsform wird die Probe aus  
einer natürlichen Quelle direkt in die Analyse überführt.

5 Zur erleichterten Datenverwaltung und -verarbeitung weist  
der Analysechip ferner ein Speichermedium auf.

Das erfindungsgemäße Analyse- bzw. Diagnostikinstrument hat  
10 gegenüber dem Stand der Technik insbesondere die Vorteile,  
daß die zu untersuchende Probe nur an einer Stelle auf die  
mikrofluidische Struktur aufgebracht werden muß, wodurch die  
Verfahrenszeit erheblich reduziert werden kann, es auf ein-  
fache und kostengünstige Weise herstellbar ist, da die  
15 mikrofluidische Struktur gleichzeitig mit dem Träger herge-  
stellt werden kann, die theoretische Signalstärke durch die  
Mikrostrukturierung im Bereich der Proben verstärkt werden  
kann, ein effizienterer Reaktionsnachweis möglich ist,  
und/oder fertigungsrelevante und/oder sonstige Daten, wie  
20 z.B. Konfiguration, Fertigungsloft, Nullkontrolldaten, Pati-  
entendaten, Verfallsdatum, Analyseergebnisse und ähnliches  
direkt auf dem Analysechip gespeichert werden können. Ein  
weiterer Vorteil besteht darin, daß die Ergebnisse der Ana-  
lyse, aufgrund einer vorzugsweise mindestens doppelt redun-  
25 dant vorhandenen Matrix, mit erheblich höherer Sicherheit  
festgestellt werden können. Ferner erfolgt die Analyse mit  
hoher Integrationsdichte und hoher Parallelität. Es sind nur  
kleine Volumina der Proben erforderlich. Weitere Vorteile  
sind die Miniaturisierung des Analysechips, die Möglichkeit  
30 einer Realtime- und/oder Online-Auswertung zeitgleich mit  
der Hybridisierungsreaktion.

Die Erfindung wird im folgenden anhand einer bevorzugten  
Ausführungsform beispielhaft beschrieben. In den Zeichnungen  
35 zeigt:

- 1 Fig. 1 ein Raumbild eines Analysechips gemäß der Erfindung;  
Fig. 2 einen Schnitt entlang der Fläche II-II von Fig. 1  
zur Verdeutlichung der Lichteinkopplung zum Nachweis  
von Fluorochrommolekülen;
- 5 Fig. 3 das Detail III aus Fig. II; und  
Fig. 4 das Prinzip der Lichteinkopplung zum Nachweis der  
Massenanlagerung.

10 Das in Fig. 1 dargestellte Analyse- bzw. Diagnostikinstrument 2 - kurz Analysechip - besteht im wesentlichen aus einem Träger oder Tragrahmen 4, der im Querschnitt z.B. ein U-förmiges Profil aufweist, das an seinen Enden geschlossen ist, so daß unter einer Oberfläche 6 ein Hohlraum 8 vorgesehen ist. Auf der Oberfläche 6 des Trägers 4 ist eine mikrofluidische Struktur, z.B. eine Mäanderstruktur 10 vorgesehen, die in den Träger 6 oder bevorzugt in mindestens ein vorzugsweise transparentes Medium 12 und 14 eingelassen ist. Dieses transparente Medium 12 und 14 ist z.B. ein Einsatz aus Glas, Quarzglas, Kunststoff, Silizium, Silikaten. Die Mäanderstruktur 10 ist so ausgebildet, daß darin Punkte (Dots) 16 einer Biomolekülmatrix aufgebracht werden können, wobei jeder Punkt 16 der Matrix vorzugsweise eine individuelle Molekülspesies (DNA, RNA, Proteine, Peptide, Polysaccharide usw. repräsentiert. Die Mäanderstruktur 10 mit den Dots 16 ist auf dem Analysechip 2 mindestens einmal vorhanden, nämlich auf dem Medium 12, vorzugsweise jedoch mindestens doppelt redundant, also auch mindestens auf dem Medium 14 oder weiteren Medien (nicht dargestellt).

15

20

25

30

35

Ebenso ist es möglich, die Oberfläche des Analysechips bzw. des Mediums 12 und 14 planar auszugestalten (ohne mikrofluidische Struktur) und die mindestens eine Biomolekülmatrix darauf vorzusehen. In diesem Fall weist dann eine der Biomolekülmatrix gegenüberliegende Fläche, die das fluidische Volumen mit der zu untersuchenden Probe enthält, die mikrofluidische Struktur auf. Der Analysechip 2 wird dann zur

1 Analyse auf diese Fläche aufgesetzt. Die mikrofluidische Struktur 10 kann ferner sowohl auf der Oberfläche 6 des Analysechips 2 als auch auf der gegenüberliegenden Fläche vorgesehen sein.

5

Der Träger 4 des Analysechips ist vorzugsweise ein Kunststoff, der durch Mikrospritzguß hergestellt wird. Als Trägermaterialien eignen sich insbesondere Derivate von Polycarbonat. Die kovalente Kopplung von Biomolekülen erfolgt vorzugsweise an semifluidischen, gelartigen Polymeroberflächen im Bereich der Proben (z.B. Polymerbrush). Die Polymeroberflächen besitzen eine eigene Hydrodynamik, wodurch den Polymeroberflächen besondere hydrodynamische Eigenschaften verliehen werden und das Verhältnis zwischen Signal und Hintergrundrauschen positiv beeinflußt wird. Semifluidische Polymeroberflächen sind direkt auf der Oberfläche 6 des Analysechips synthetisiert und können als Nano- bis Mikrostrukturierung von Oberflächen i.a. als Polymerbrushes bezeichnet werden. Die theoretische Signalstärke wird durch die semifluidische Oberflächenstrukturierung im Bereich der Proben verstärkt.

Zum Betrieb des Analysechips wird z.B. genetisches Material aus einer zu untersuchenden biologischen Probe isoliert, spezifisch amplifiziert und gegebenenfalls markiert. Das so gewonnene Sondenmaterial wird mittels einer Vorrichtung, z.B. einer Pipette oder Spritze, auf ein Ende der Mäanderstruktur 10 des Analysechips 2 aufgebracht. Die zu untersuchende biologische Probe bzw. das genetische Material überströmt entlang der Mäanderstruktur 10 die einzelnen Punkte 16 der Biomolekülmatrix, die jeweils eine individuelle Molekülspezies repräsentieren, und hybridisiert im Fall von mindestens teilweise komplementären Biomolekülen.

35

1 Zur Analyse und Auswertung der Daten des Analysechips 2 stehen dem Fachmann eine Reihe von Verfahren zur Verfügung.  
5 Zwei prinzipielle Verfahren werden erfindungsgemäß bevorzugt. Einerseits kann die Auswertung durch eine Echt-Zeit-Messung der Hybridisierung durch Nachweis der Massenanlagerung erfolgen, indem der Analysechip mit einem Gitterkoppler versehen ist, der eine Störung des evaneszenten Felds verursacht. Andererseits besteht die Möglichkeit, durch visuelle oder opto-chemische Mittel nachweisbare Moleküle zwei Fluorochrommoleküle nachzuweisen, die z.B. in das Sondenmaterial  
10 (DNA, RNA) vor der Analyse eingebaut wurden.

Der in den Figuren 1 bis 3 dargestellte Analysechip gemäß der Erfindung ist insbesondere für fluorochrommarkierte  
15 Systeme geeignet. Der in Fig. 4 dargestellte Analysechip ist zur Auswertung mit einem Hybridisierungsnachweis durch Massenanlagerung geeignet.

Der Analysechip 2 weist am Außenrand des Trägers 4 Justiermittel 18, wie z.B. Justiernasen oder -einbuchtungen, auf,  
20 so daß der beim Einlegen in einen Analysator (nicht dargestellt) zur Auswertung der Untersuchung genau justierbar ist. Dies ist insbesondere deshalb vorteilhaft, weil die einzelnen Dots 16 der Biomolekülmatrix sowie die Schleifen der Mäanderstruktur 10 vorzugsweise selbst relativ dicht beieinander liegen, z.B. mit einem Abstand zwischen 100 und  
25 500 µm. Es wird sichergestellt, daß die einzelnen Punkte 16 des Analysechips 2 mit entsprechenden Auswerteelementen des Analysators korrespondieren.

30

Der Analysechip 2 weist ferner mindestens ein Speichermedium auf, das Betriebsdaten, fertigungsrelevante Daten wie z.B. Konfiguration, Fertigungslot, Null-Kontrolldaten, eingegebene Patientendaten, das Verfallsdatum,  
35 Analyseergebnisse und weitere Hilfsdaten speichern kann. Das Speichermedium ist vorzugsweise ein elektronischer

- 1 Speicherchip 20, ein Magnetstreifen 22 und/oder ein Barcode 24, kann jedoch auch jedes andere bekannte Speichermedium, wie z.B. ROM oder RAM, sein.
- 5 Der in den Figuren 2 und 3 dargestellte Analysechip 2 weist neben den mit Bezug auf Fig. 1 beschriebenen Merkmalen die für den Nachweis von Fluorochrommolekülen vorteilhaften Merkmale auf.
- 10 Die Analyse einer biologischen Probe in der Mäanderstruktur 10 des Analysechips 2 erfolgt dadurch, daß in einem Analysator der Analysechip 2 von der Mäanderstruktur 16 abgewandten Seite, d.h. vom Hohlraum 8, beleuchtet wird, was in Form des Pfeils 26 schematisch dargestellt ist. Die Unterseite 28 der Oberfläche 6 ist vorzugsweise mit einem optischen Linsenfeld 30 versehen, das eine konfokale Beleuchtung ermöglicht. Das Linsenfeld 30 ist vorzugsweise so ausgebildet, daß es sich genau unterhalb der Mäanderstruktur 10, insbesondere genau unterhalb der Dots 16 befindet, so daß die in Fig. 3 dargestellte Beleuchtung der einzelnen Dots 16 ermöglicht wird. Das Linsenfeld 30 und der Träger 4 des Analysechips 2 können aus einem einheitlichen Material bestehen, das in einem Schritt z.B. durch Mikrospritzguß hergestellt werden kann. Vorzugsweise befindet sich das Linsenfeld 30 jedoch auf der Unterseite 28 des in den Träger 4 eingelegten transparenten Mediums 12 bzw. 14.
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- Die Beleuchtung 26 von der Unterseite 28 des Analysechips 2 bringt insbesondere den Vorteil, daß die Intensität der Lichtquelle reduziert werden kann, da die Lichtstrahlen keinen Strahlteiler durchlaufen müssen. Das einfallende Licht 26 wird durch die Linsen des Linsenfelds 30 auf die einzelnen Punkte 16 der Biomolekülmatrix fokussiert, wodurch die Dots 16, die mit der zu untersuchenden Probe eine Reaktion hervorgerufen haben, durch die Fluorochrommoleküle Fluoreszenz bewirken. Weitere Möglichkeiten zum Nachweis der

1 Moleküle beruhen auf dem Prinzip der Biolumineszenz, z.B.  
Phosphoreszenz, radioaktiven Markierungen, die durch  
Auflegen von Röntgenfilmen nachgewiesen werden können. Durch  
eine geeignete Auswerteschaltung, z.B. eine opto-  
5 elektronische Schaltung, kann dann eine weitere Verarbeitung  
der gewonnenen Daten bezüglich der zu analysierende Probe  
erfolgen. Diese Daten können zusammen mit dem in dem  
Speichermedium gespeicherten Daten weiter verarbeitet  
und/oder in den Speicher des Analysechips 2 geschrieben  
10 werden.

Fig. 4 zeigt die Lichteinkopplung für Analysechips, bei  
denen der Hybridisierungsnachweis über den Nachweis der Mas-  
senanlagerung erfolgt. Dazu wird ein optisches Verfahren  
15 benutzt, bei dem die Lichteinkopplung über eine Vielzahl von  
Gittern 32 erfolgt, wodurch das evanescente Feld beeinflußt  
wird. Diese Beeinflussung ist im Fernfeld 39 meßbar. Jedem  
Punkt 16 der Biomolekülmatrix in der mikrofluidischen Struk-  
tur 10 ist exakt ein optisches Gitter 32 zugeordnet, so daß  
20 die Effizienz der Lichteinkopplung erheblich erhöht werden  
kann. Das Licht 34 einer Beleuchtungsquelle wird über ein  
zweidimensionales Linsenfeld 36 oder über ein zweidimensio-  
nales Fresnel-Linsenfeld, z.B. ein Hologramm oder diffrak-  
tive Optik, auf die in der Matrix angeordneten Gitter 32 fo-  
25 kussiert. Dadurch kann ein effizienter Hybridisierungsnach-  
weis durch den Nachweis der Massenanlagerung erzielt werden,  
wenn eine Auswertung des Fernfelds erfolgt. Die gewonnenen  
Analysedaten können zusammen mit den im Speichermedium ge-  
speicherten Daten in einem Analysator (nicht dargestellt)  
30 durch Verwendung geeigneter Auswerteschaltungen, z.B. opto-  
elektronische Schaltungen, weiter verarbeitet und/oder in  
den Speicher des Analysechips 2 geschrieben werden.

1 Die optischen Gitter 32 wurden vorzugsweise zusammen mit den  
jeweiligen Punkten 16 der Biomolekülmatrix, die jeweils eine  
individuelle Molekülspesies (DNA, RNA, Proteine, Peptide,  
Polysaccharide usw.) repräsentieren, in die mikrofluidische  
5 Struktur 10 eingebracht. Die zu untersuchende biologische  
Probe durchläuft die mikrofluidische Struktur 16 (Mäander-  
struktur) z.B. in Richtung der Pfeile 38. das Linsenfeld 36  
befindet sich auf der von der Biomolekülmatrix abgewandten  
Seite des Gitters 32. Es kann, ähnlich wie zuvor mit Bezug  
10 auf die Figuren 2 und 3 beschrieben, ebenfalls im Hohlraum 8  
des Analysechips 2 vorgesehen sein. Ebenso kann es zusammen  
mit dem Träger 4 aus einem einheitlichen Material bestehen,  
oder, vorzugsweise, an den transparenten Medien 12 und 14  
vorgesehen sein.

15

Neben den mit Bezug auf die Figuren 2 bis 4 beschriebenen  
Auswerteverfahren zur Auswertung der Analysechips 2 ist der  
erfindungsgemäße Analysechip ebenso für weitere, nicht näher  
beschriebene Auswerteverfahren geeignet.

20

Die Ausbildung der mikrofluidischen Struktur 16 als Mäander-  
struktur ist lediglich exemplarisch, es sind vielmehr auch  
beliebige andere mikrofluidische Strukturen, wie z.B. eine  
Baumstruktur möglich.

25

30

35

**Patentansprüche**

1. Analysechip (2) zur Untersuchung von biologischen Proben, der einen Träger (4) aufweist, auf dessen Oberfläche (6) mindestens eine Biomolekülmatrix (16) durch kovalente Kopplung von Biomolekülen an semifluidische, gelartige Polymeroberflächen im Bereich der Proben aufgebracht ist.
2. Analysechip (2) zur Untersuchung von biologischen Proben, der einen Träger (4) aufweist, auf dessen Oberfläche (6) mindestens eine Biomolekülmatrix (16) aufgebracht ist, wobei die zu untersuchende biologische Probe über jede Biomolekülmatrix (16) strömt und der Analysechip (2) mindestens ein Speichermedium (20, 22, 24) aufweist.
3. Analysechip (2) nach Anspruch 1 oder 2, wobei der Träger (4) aus einem Kunststoff hergestellt ist.
4. Analysechip (2) nach Anspruch 3, wobei der Kunststoff insbesondere ein Derivat von Polycarbonat ist.
5. Analysechip (2) nach Anspruch 4, wobei die Biomolekülmatrix (16) durch kovalente Kopplung von Biomolekülen an semifluidische, gelartige Polymeroberflächen im Bereich der Proben aufgebracht ist.
6. Analysechip (2) nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Biomolekülmatrix einzelne Dots (16) aufweist.
7. Analysechip (2) nach Anspruch 6, wobei jeder Dot (16) der Biomolekülmatrix eine individuelle Molekülspezies repräsentiert.

- 1 8. Analysechip (2) nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei die Oberfläche (6), auf der die Biomolekülmatrix (16) aufgebracht ist, planar ist.
- 5 9. Analysechip (2) nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei die Oberfläche (6) eine mikrofluidische Struktur (10) aufweist, in der die Biomoleküle vorgesehen sind.
- 10 10. Analysechip (2) nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Träger (4) mindestens ein Medium (12, 14) aufweist, auf dem sich die Biomolekülmatrix (16) befindet.
- 15 11. Analysechip (2) nach Anspruch 10, wobei das Medium (12, 14) Glas, Quarzglas, ein Kunststoff oder Silicium-Silikat ist.
- 20 12. Analysechip (2) nach einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei der Analysechip ferner mindestens ein Speichermedium (20, 22, 24) aufweist.
- 25 13. Analysechip (2) nach einem der Ansprüche 1 bis 12 oder 12, wobei das Speichermedium ein elektronischer Speicherchip (20), ein Magnetstreifen (22) und/oder ein Barcode (24) ist.
- 30 14. Analysechip (2) nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei der Träger (4) ferner Justiermittel (18) zum exakten Einlegen in einen Analysator aufweist.
- 35 15. Analysechip (2) nach einem der Ansprüche 3 bis 14, wobei der Träger (4) ein Mikrospritzguß-Element ist.
16. Analysechip (2) nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Biomolekülmatrix (16) mindestens doppelt redundant vorhanden ist.

- 1 17. Analysechip (2) nach einem der Ansprüche 9 bis 16, wobei die mikrofluidische Struktur (10) einen mäanderförmigen Kanal bildet.
- 5 18. Analysechip (2) nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei an einer Unterseite (28) des Trägers (4) ein optisches Linsenfeld (30; 36) vorgesehen ist.
- 10 19. Analysechip (2) nach Anspruch 18, wobei das Linsenfeld (36) ein zweidimensionales Fresnel-Linsenfeld ist.
- 15 20. Analysechip (2) nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei entsprechend der Biomolekülmatrix (16) eine Vielzahl optischer Gitter (32) vorgesehen ist.
- 20 21. Analysechip (2) nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei zur Auswertung der biologischen Proben der Analysechip (2) so ausgestaltet ist, daß die Biomolekülmatrix (16) von einer der Oberfläche (6) gegenüberliegenden Unterseite (28) mit Lichtstrahlen (26; 34) von einer Lichtquelle beaufschlagt werden kann.
- 25 22. Verwendung des Analysechips (2), insbesondere nach einem der vorhergehenden Ansprüche, zur Untersuchung von DNA-, RNA-Molekülen, Proteinen, Peptiden und/oder Polysacchariden.
- 25 23. Verfahren zur Analyse von Biomolekülen auf einem Analysechip, insbesondere nach einem der vorhergehenden Ansprüche, mit den folgenden Verfahrensschritten:
  - 30 (a) Aufbringen einer zu analysierenden Probe auf eine Oberfläche (6), die mindestens eine Biomolekülmatrix (16) aufweist;
  - (b) Überströmen der Biomolekülmatrix (16) durch die Probe entlang einer mikrofluidischen Struktur;
  - 35 (c) Einlegen des Analysechips (2) in einen Analysator; und
  - (d) Auswerten des Analysechips (2).

1

24. Verfahren nach Anspruch 23, wobei die Auswertung des Analysechips (2) durch Einstrahlen von Licht von einer Unterseite (28) des Analysechips (2) erfolgt.

5

25. Verfahren nach Anspruch 23 oder 24, wobei die Auswertung des Analysechips (2) durch Lichteinkopplung über ein optisches Linsenfeld (36) und Gitter (32) erfolgt, wobei jedes Gitter (32) jeweils einem Punkt (16) der Biomolekülmatrix zugeordnet ist und das optische Linsenfeld (36) die einfallenden Lichtstrahlen auf die jeweiligen Gitter (32) fokussiert, so daß bei einer Massenanlagerung das evaneszente Feld beeinflußt und diese Beeinflussung im Fernfeld meßbar wird.

10

26. Verfahren nach Anspruch 23 oder 24, wobei die Auswertung des Analysechips (2) durch Lichteinkopplung über ein Linsenfeld (36) erfolgt, das am Analysechip (2) integriert ist und eine konfokale Beleuchtung bewirkt, so daß entsprechend markierte Systeme einen optisch erkennbaren Reaktionsnachweis liefern.

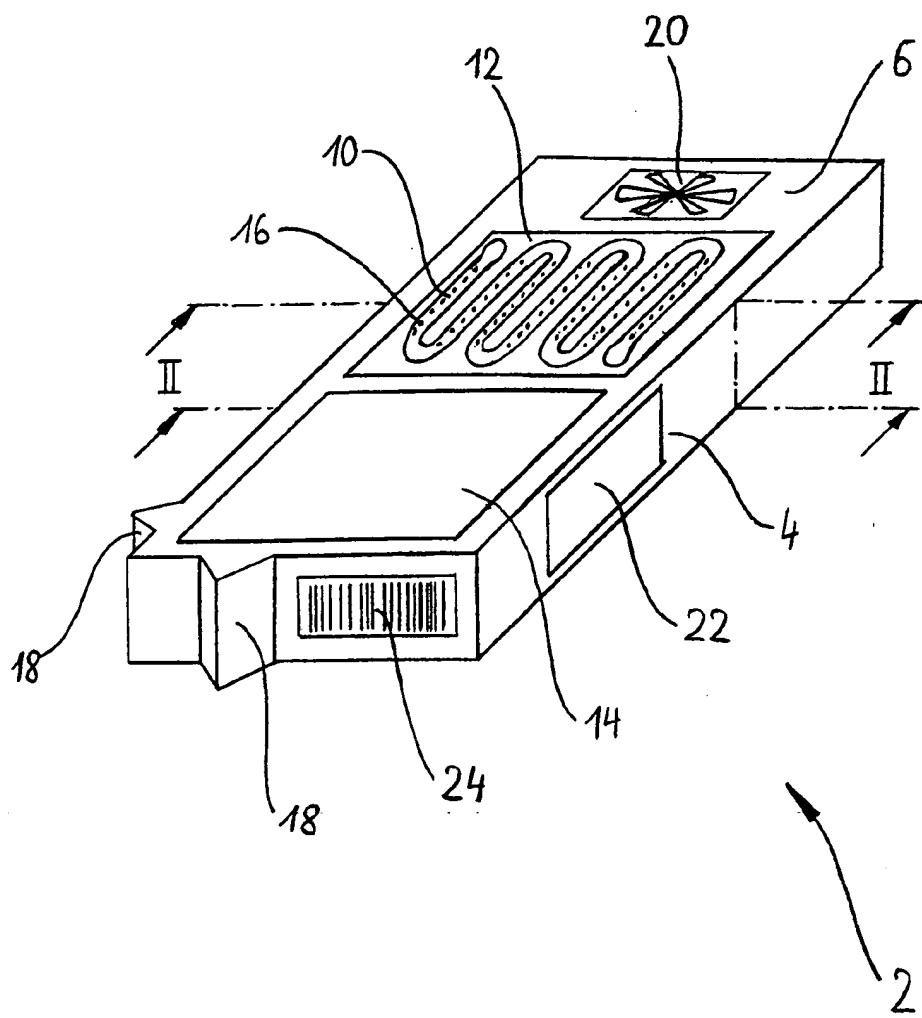
15

25

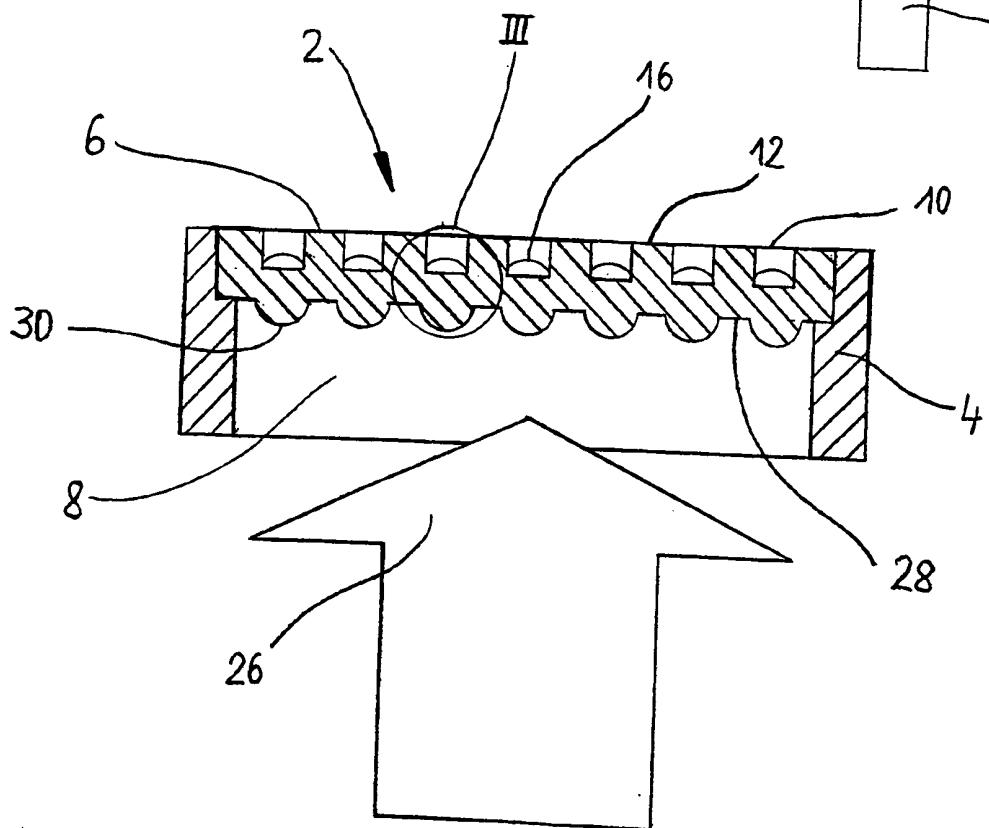
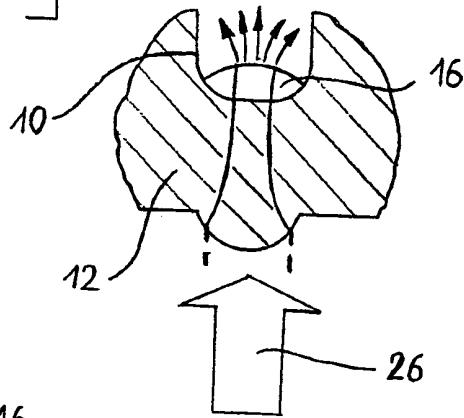
30

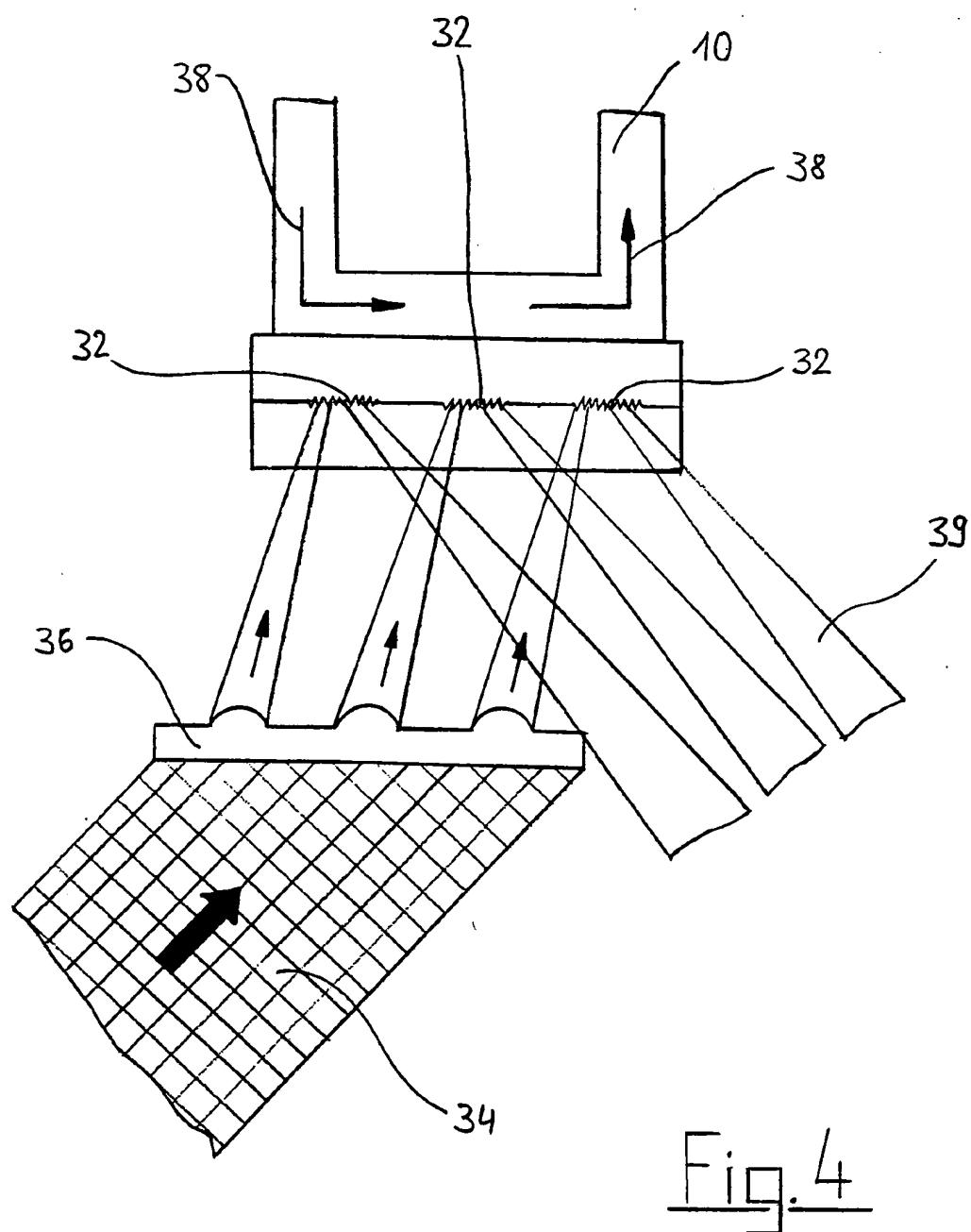
35

1/3

Fig. 1

2/3

Fig. 2Fig. 3



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

**BLACK BORDERS**

**IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

**FADED TEXT OR DRAWING**

**BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

**SKEWED/SLANTED IMAGES**

**COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

**GRAY SCALE DOCUMENTS**

**LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

**REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

**OTHER: \_\_\_\_\_**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

